

食品与饲料用化学品

酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物乳化性及抑菌性

王柏棋¹, 陈菲¹, 马一帆¹, 范志军², 金花¹, 许晶^{1*}

(1. 东北农业大学 文理学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省北大荒绿色健康食品有限责任公司, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 按照酯化大豆蛋白与壳聚糖质量比为 1 : 0.1, 将酯化大豆蛋白与壳聚糖溶液混合并常温搅拌 3 h, 制得了酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物, 采用 FTIR 和荧光光谱对其进行了表征, 探讨了酯化改性协同壳聚糖复合改性对复合物乳化性和抑菌性的影响。结果表明, 氢键参与了酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的形成过程; 在 pH 5.0 下, 相较于酯化大豆蛋白, 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物 (MSPI-CS)、酯化大豆球蛋白-壳聚糖复合物 (M11S-CS)、酯化 β -伴大豆球蛋白-壳聚糖复合物 (M7S-CS) 的乳化活性分别提升至 10.8、9.0、12.0 m²/g, 乳化稳定性分别提升至 88.9、71.4、95.4 min; MSPI-CS、M11S-CS、M7S-CS 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌圈直径均增加; 以 MSPI-CS、M11S-CS、M7S-CS 为乳化剂制备乳液, 乳液的平均粒径降低至 (255.2±5.3)、(315.6±2.4)、(253.6±1.7) nm, Zeta 电位绝对值提升至 (22.07±0.40)、(20.68±0.09)、(22.33±0.88) mV, 同时乳液储存稳定性提高。

关键词: 酯化大豆蛋白; 壳聚糖; 复合物; 乳化性; 抑菌性; 乳液稳定性; 食品化学品

中图分类号: TS214.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 08-1674-08

Emulsifying property and antibacterial activity of esterified soybean protein-chitosan complex

WANG Baiqi¹, CHEN Fei¹, MA Yifan¹, FAN Zhijun², JIN Hua¹, XU Jing^{1*}

(1. College of Art and Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; 2. Heilongjiang Beidahuang Green Healthy Food Co., Ltd., Jiamusi 154007, Heilongjiang, China)

Abstract: Esterified soybean protein-chitosan complex was prepared from esterified soybean protein solution and chitosan solution with a mass ratio of esterified soybean protein to chitosan of 1 : 0.1 by stirring the mixture at room temperature for 3 h, and characterized by FTIR and fluorescence spectrum. Furthermore, the influence of esterification along with chitosan addition on the emulsifying property and antibacterial activity of the complex was discussed. The results showed that hydrogen bonds were involved in the formation of esterified soybean protein-chitosan complex. At pH 5.0, compared with those of esterified soybean protein, the emulsifying capacity of esterified soybean protein chitosan complex (MSPI-CS), esterified glycinin-chitosan complex (M11S-CS) and esterified β -conglycinin-chitosan complex (M7S-CS) were increased to 10.8, 9.0 and 12.0 m²/g, and the corresponding emulsion stability were increased to 88.9, 71.4, and 95.4 min, respectively. The inhibition zone diameter of MSPI-CS, M11S-CS and M7S-CS against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* increased. The average particle size of emulsions with MSPI-CS, M11S-CS and M7S-CS as emulsifiers were decreased to (255.2±5.3), (315.6±2.4) and (253.6±1.7) nm, and the absolute values of Zeta potentials increased to (22.07±0.40), (20.68±0.09) and (22.33±0.88) mV. At the same time, the storage stability of the emulsions was improved.

Key words: esterified soybean protein; chitosan; complex; emulsification; bacteriostasis; emulsion stability; food chemicals

收稿日期: 2022-01-15; 定用日期: 2022-04-27; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220055

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31901605); 黑龙江省重点研发计划项目 (GA21B001)

作者简介: 王柏棋 (1997—), 女, 硕士生, E-mail: 18845043529@163.com。联系人: 许晶 (1979—), 女, 教授, E-mail: xujing@neau.edu.cn。

大豆分离蛋白(SPI)主要由两种储存蛋白[β -伴大豆球蛋白(7S)和大豆球蛋白(11S)]组成^[1], 营养丰富并具有两亲特性, 可作为乳化剂应用于食品领域^[2]。然而, 当大豆蛋白在酸性条件下尤其是接近等电点($pI=4.5$)时, 易发生聚集沉淀, 这极大地限制了其在食品加工中的应用^[3]。另外, 为延长大豆蛋白食品货架期, 在食品配方中添加防腐剂往往会降低消费者对产品的认可度。因此, 对大豆蛋白分子进行改性修饰以拓展蛋白质在酸性条件下稳定乳液的能力和抑菌性具有重要意义。

酯化改性是蛋白质在含有酸催化剂的醇中发生酯化反应, 通过醇中的羟基对蛋白质游离羧基的亲核攻击导致蛋白质净电荷发生变化, 从而改变蛋白质的构象和功能性质。同时, 由于酸性条件下酯化蛋白表面所带的正电荷量提高, 可通过静电作用抑制微生物的生长^[4-6]。壳聚糖(CS)是一种在相对较低 $pH(<6.5)$ 下带正电荷的天然阳离子多糖, 不仅是一种天然增稠剂和稳定剂, 而且具有抑菌性^[7], 能够通过氢键与蛋白质结合形成复合物, 显著改善蛋白质的功能性质, 弥补单一蛋白质在食品领域中应用的不足^[8]。例如, YUAN等^[9]研究了7S-壳聚糖复合物的乳化性能, 结果表明, 7S-壳聚糖复合物具有较高的稳定乳液的能力, 除此之外, 他们还发现相比于7S制备的乳液, 由7S和壳聚糖复合物制备的乳液对大肠杆菌表现出更好的抑制作用; LIU等^[10]向SPI中加入壳聚糖, 研究大豆蛋白-壳聚糖复合物功能性质, 结果表明, 壳聚糖可以提高大豆蛋白的溶解度, 且相比于天然大豆蛋白, 复合物的乳化性能得到显著提升, 絮凝程度降低。

综上所述, 天然大豆蛋白与壳聚糖复合物在稳定乳液和抑菌方面具有优势。但是, 大豆蛋白先经过酯化处理再与壳聚糖复合, 即酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的乳化性和抑菌性及其对乳液稳定性的影响还鲜见报道。因此, 本实验以SPI、7S和11S为原料, 制备酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物。利用红外光谱和荧光光谱分别分析酯化大豆蛋白和壳聚糖之间的相互作用及复合物的结构; 考察酸性条件下, 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的乳化性和抑菌性; 在酸性条件下, 以酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物作为乳化剂制备乳液, 分析乳液的储存稳定性。本研究为进一步拓宽大豆蛋白在酸性食品领域中的应用, 提高大豆制品的附加值提供了理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

低温脱脂大豆粕粉, 山东招远食品有限公司;

食品级壳聚糖[平均相对分子质量 $(15\sim 50)\times 10^5$, 脱乙酰度 $>90\%$, 水分质量分数 8.0% , 灰分质量分数 0.7%], 山东奥康生物科技有限公司; NaOH、冰乙酸, AR, 天津市天力化学试剂有限公司; 无水甲醇, AR, 天津市富宇精细化工有限公司; 浓HCl, AR, 韶关高科祥高新材料有限公司; 十二烷基磺酸钠(SDS), AR, Biotopped有限公司; 玉米油, 九三粮油工业集团有限公司; 实验菌种, 中国普通微生物菌种保藏管理中心; 营养肉汤培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 营养琼脂培养基, 广东环凯微生物科技有限公司。其他试剂均为市售分析纯。

IRTracer-100 傅里叶变换红外光谱仪, 日本 Shimadzu 公司; Z36HK 高速离心机, 德国 Hermle 公司; F-4700 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司; 手提式压力蒸汽灭菌器, 山东新华医疗器械股份有限公司; 303-00A 型电热恒温培养箱, 天津赛得利斯实验分析仪器制造厂; Zetasizer Nano Zeta 电位分析仪, 英国 Malvern 公司; T6 新世纪紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; EL20 实验室 pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; JY92-2D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Nano-S90 纳米激光粒度仪, 英国 Malvern 公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆蛋白的提取

采用文献[11-12]的方法提取大豆蛋白。SPI 提取步骤: 将 100 g 低温脱脂大豆粕粉与 1000 mL 蒸馏水混合, 用 0.5 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0 并搅拌 2 h, 使用离心机离心(1750 g 离心 15 min), 然后用 0.5 mol/L HCl 将上清液 pH 调至 4.5, 静置 30 min 后再次离心(1750 g 离心 20 min), 得到 SPI 沉淀。

11S 和 7S 提取步骤: 将 100 g 低温脱脂大豆粕粉与 1500 mL 蒸馏水按照料液比 1 : 15 (g : mL) 混合, 用 0.5 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.5, 在 45 °C 搅拌 1 h, 然后 4 °C 静置 2 h, 使用离心机离心(1750 g 离心 15 min)。向上清液中加入亚硫酸氢钠(根据离心后上清液的体积计算加入亚硫酸氢钠的质量, 使上清液中亚硫酸钠的浓度达到 0.01 mol/L), 用 0.5 mol/L HCl 调节 pH 至 6.4, 4 °C 放置过夜(12 h), 使用离心机二次离心(1750 g 离心 20 min), 得到 11S 沉淀。向二次离心后的上清液中加入 NaCl(根据二次离心后上清液的体积计算加入 NaCl 的质量, 使上清液中 NaCl 的浓度达到 0.25 mol/L), 用 0.5 mol/L HCl 调节 pH 至 5.4, 4 °C 放置 2 h, 1750 g 离心 15 min 后, 去除杂蛋白沉淀。在第 3 次离心后的上清液中, 加入上清液体积 1 倍的冰水, 以稀释上清液, 用 0.5 mol/L HCl 将上清液 pH 调至 4.8, 4 °C 放置 2 h,

然后 1750 g 离心 20 min, 得到 7S 沉淀。将蛋白质沉淀冻干 (−80 °C, 24 h) 备用。使用凯氏定氮仪测得 SPI 质量分数为 91.01%, 11S 质量分数为 81.64%, 7S 质量分数为 86.84%。

1.2.2 大豆蛋白的酯化改性

根据 SITOHY 等^[13]方法并稍作修改, 利用预实验筛选的反应条件, 分别取 1.2.1 节中制备的蛋白质粉末 (SPI、7S 和 11S) 20 g 与 400 mL 甲醇 (体积分数>99.5%) 混合, 向蛋白质与甲醇混合物中加入 57.1 mL 浓 HCl (12 mol/L), 使 HCl 最终浓度为 1.5 mol/L; 然后 4 °C 下搅拌混合液 (SPI 和 11S 均反应 10 h, 7S 反应 8 h), 反应完毕后抽滤得到固体产品, 使用同体积 4 °C 冷无水乙醇反复 3 次清洗产品, 去除残留的 HCl 和甲醇。将酯化大豆蛋白固体分散在蒸馏水中, 4 °C 下透析 (透析袋截留相对分子质量为 3500) 72 h, 冻干 (−80 °C, 24 h) 备用。酯化改性后的 SPI、11S、7S 分别表示为 MSPI、M11S、M7S。根据 CHANG 等^[14]方法确定蛋白质酯化率和等电点, MSPI、M11S、M7S 酯化率分别为 75%、69%、78%, 等电点分别为 pH 10.3、9.0、10.4。

1.2.3 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的制备

参考 YUAN 等^[9]研究方法并稍作修改。将 2 mL 冰乙酸与 100 mL 超纯水混合, 加入 2 g 壳聚糖, 室温搅拌 3 h 后, 置于冰箱冷藏层中水化过夜 (12 h) 得到壳聚糖母液。利用预实验筛选的反应条件, 按照 $m(\text{酯化大豆蛋白}) : m(\text{壳聚糖}) = 1 : 0.1$, 将 10 g 酯化大豆蛋白与 51 mL 壳聚糖母液混合并常温搅拌 3 h。反应结束后, 将样品冻干 (−80 °C, 24 h) 备用。MSPI、M11S 和 M7S 与壳聚糖复合物分别表示为 MSPI-CS、M11S-CS 和 M7S-CS。此外, 将 10 g MSPI、M11S、M7S 在 51 mL 上述冰乙酸水溶液中室温搅拌 3 h。然后, 将溶液 pH 用 0.5 mol/L 的 NaOH 调至 5.0 作为对照样品, 样品分别命名为 MSPI (pH 3.0-5.0)、M11S (pH 3.0-5.0)、M7S (pH 3.0-5.0)。

1.2.4 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的红外光谱分析

参考 SUN 等^[15]方法, 按照 $m(\text{样品}) : m(\text{溴化钾}) = 1 : 100$, 将 2 mg 样品与 200 mg 溴化钾均匀混合后压成固体薄片, 使用红外光谱仪测定样品的红外光谱。仪器参数分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描次数 64 次, 光谱波数范围为 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 。

1.2.5 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的荧光光谱分析

参考 LIU 等^[16]方法并稍作修改, 分别配制质量浓度为 0.2 g/L 的酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0)、酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物溶液, 使用荧光分光光度计对样品的内源性荧光光谱进行测定。仪器参数设定为激发波长 290 nm, 扫描范围

300~500 nm, 激发狭缝与发射狭缝均为 5 nm。

1.2.6 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的乳化性分析

样品的乳化活性与乳化稳定性参照 PEARCE 等^[17]的方法, 并稍作修改。分别取 12 mL 质量浓度为 10 g/L 的酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0)、酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物溶液, 加入 4 mL 玉米油进行均质 (10000 r/min 均质 2 min), 制备油相体积分数为 25% 的乳液。分别在 0 和 10 min 时, 从底部取 40 μL 乳液, 并与 5 mL 1 g/L 的 SDS 溶液混合, 振荡摇匀后, 在 500 nm 处测量吸光度。按照下式计算样品的乳化活性 (EAI, m^2/g) 和乳化稳定性 (ESI, min)。

$$\text{EAI} = \frac{2 \times 2.303 \times A_1 \times N}{\rho \times (1 - \varphi) \times t} \quad (1)$$

$$\text{ESI} = \frac{A_1}{A_1 - A_2} \times t \quad (2)$$

式中: N 为稀释倍数 (125); ρ 为蛋白质质量浓度 (g/L); φ 为乳液中油相的体积分数 (25%); A_1 为 0 min 时样品的吸光度; A_2 为 10 min 时测定的吸光度; t 为乳化时间, 取值 10 min。

1.2.7 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的抑菌性分析

参考 SITOHY 等^[13]方法并稍作修改, 将含 1.0×10^9 CFU/mL 细菌的营养肉汤培养基用无菌生理盐水稀释至 1.0×10^6 CFU/mL, 制得菌悬液。待菌悬液在营养琼脂培养基均匀涂布后, 将牛津杯放置在培养基上, 然后将 150 μL 复合物溶液加入牛津杯中 [复合物溶液 pH 5.0, 蛋白质质量浓度 10 g/L, $m(\text{壳聚糖}) : m(\text{酯化大豆蛋白}) = 0.1 : 1$]。为排除缓冲溶液对实验结果的影响, 使用只含有天然 SPI、11S 和 7S 的相同缓冲液作为对照^[9]。将所有培养皿于 4 °C 静置 12 h, 待样品在培养基内扩散均匀, 取出培养皿恢复至室温。然后, 在 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下静置培养 24 h, 使用游标卡尺测量抑菌圈大小。

1.2.8 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的 Zeta 电位分析

参考 LI 等^[11]方法并稍作修改。使用 Zeta 电位分析仪测定样品的 Zeta 电位。为了避免多重光散射效应, 在测量之前用磷酸盐缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH 5.0) 将样品进行稀释。

1.2.9 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物乳液的制备

连续相的制备: 依据文献^[11-12]的实验方法, 使用浓度 0.01 mol/L, pH 为 5.0 的磷酸盐缓冲液分别配制 20 mL 蛋白质质量浓度为 10 g/L 的酯化大豆蛋白和酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物溶液。

分散相的制备: 以玉米油为分散相。

乳液的制备: 将 0.4 mL 玉米油缓慢加入 20 mL 连续相中, 室温下磁力搅拌 10 min。使用高速均质

分散机在 10000 r/min 下均质分散 4 min, 制备成粗乳液。在 500 W 超声功率下, 超声处理 20 min 制备乳液。在乳液的制备过程中会产生热量导致体系温度升高, 为避免温度升高给乳液带来影响, 使用冰水浴控制体系温度在 25 °C 左右。

1.2.10 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物乳液性质的测定

1.2.10.1 乳液平均粒径的测定

参考 LI 等^[11]研究方法并稍作修改, 使用纳米激光粒度仪测定样品的平均粒径。为了避免多重光散射效应, 在测量之前, 用磷酸盐缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH 5.0) 将样品进行稀释。设定分散相和连续相的折射率分别为 1.47 和 1.33。

1.2.10.2 乳液 Zeta 电位的测定

参照 1.2.8 节的方法测定乳液的 Zeta 电位。

1.2.11 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物乳液储存稳定性的测定

将乳液样品在 4 °C 下储存 28 d, 每隔 7 d, 室温下测量一次乳液的平均粒径, 以平均粒径的变化来评价乳液的储存稳定性^[18]。平均粒径测定方法同 1.2.10.1 节。

1.3 数据处理

所有实验均重复测定 2 次, 结果表示为平均值±标准差。通过统计软件包 (SPSS V20.0) 对数据进行 ANOVA 差异显著性分析, $p < 0.05$ 为差异显著。采用 Origin Version 8.1 软件进行图表的制作。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

酯化大豆蛋白与壳聚糖相互作用会引起蛋白质红外光谱的变化, 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0)、壳聚糖及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的 FTIR 谱图见图 1。

如图 1 所示, 所有的酯化大豆蛋白红外谱图中, 在 1630~1635 处和 1540 cm^{-1} 处均存在 C=O 伸缩振动 (游离羧基) 和 N—H 弯曲振动 (酰胺 II 带) 吸收峰^[19]。壳聚糖在 3440 cm^{-1} 附近显示出较强的氨基特征峰。同时, 还观察到复合物在 2867 cm^{-1} 附近出现由 C—H 伸缩振动引起的特征峰, 在 1635 cm^{-1} 附近出现由—CONH₂ 的 C=O 伸缩振动产生的特征峰, 在 1594 cm^{-1} 处为与—NH₃⁺ 缔合产生的强吸收峰, 在 1400 cm^{-1} 附近为—OH 和—CH 的伸缩振动特征峰, 在 1167 cm^{-1} 处为 C—O—C 的对称拉伸谱带, 在 1080 cm^{-1} 处为 C—O 的拉伸振动吸收峰^[20-21]。除此之外, MSPI、M11S、M7S 与壳聚糖复合物在 3000~3600 cm^{-1} 出现较宽的吸收峰, 与 MSPI、M11S 和 M7S 相比, MSPI-CS、M11S-CS 和 M7S-CS 在 1400 cm^{-1} 附近的峰位置向小波数方向移动。结果表明, 酯化大

豆蛋白与壳聚糖之间存在氢键作用。HUANG 等^[22]在 SPI 与壳聚糖相互作用的研究中也发现了相似的结果。

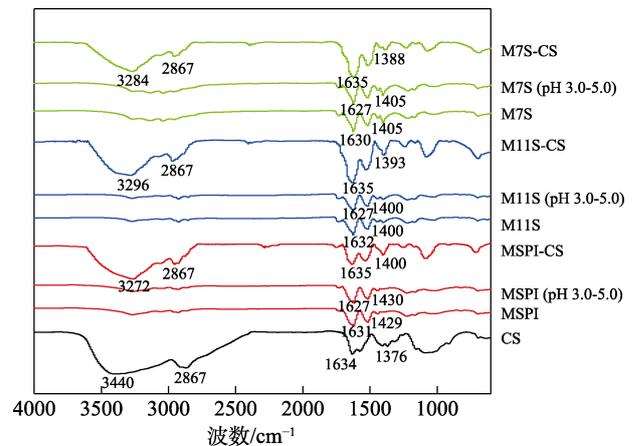


图 1 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0)、壳聚糖及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的 FTIR 谱图

Fig. 1 FTIR spectra of esterified soybean protein, esterified soybean protein (pH 3.0-5.0), chitosan and esterified soybean protein-chitosan complexes

2.2 荧光光谱分析

内源性荧光能够反映蛋白质的色氨酸残基所处微环境变化和蛋白质三级结构变化, 常被用于检测蛋白质空间结构的变化, 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的荧光光谱见图 2。

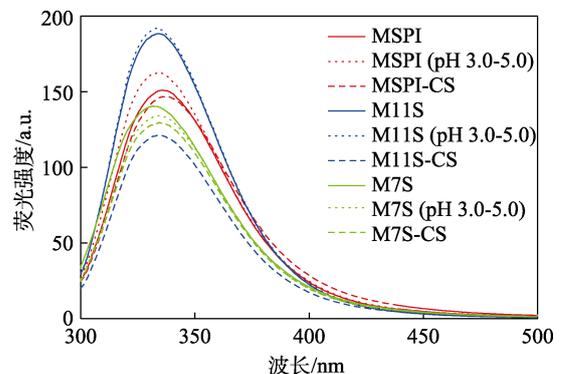


图 2 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of esterified soybean protein, esterified soybean protein (pH 3.0-5.0) and esterified soybean protein-chitosan complexes

如图 2 所示, 与酯化大豆蛋白的荧光谱图相比, pH 偏移处理后的酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 的最大荧光强度上升, 这可能是由于蛋白质内部的疏水性氨基酸暴露所致^[23]。与酯化大豆蛋白的荧光谱图相比, 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的最大荧光强度降低。表明壳聚糖和酯化大豆蛋白之间存在相互作用, 壳聚糖吸附在酯化大豆蛋白表面, 导致酯化大

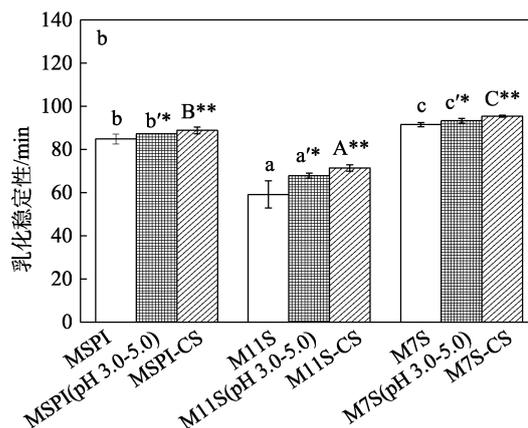
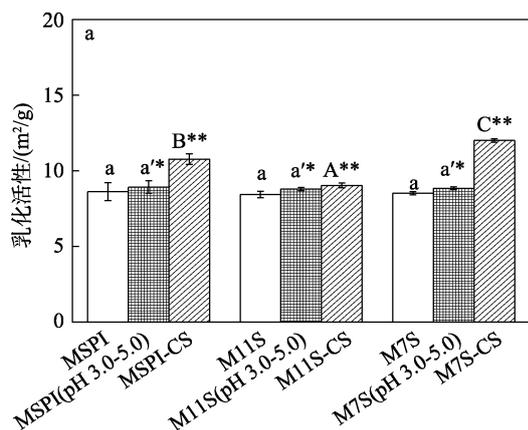
豆蛋白暴露的色氨酸减少,造成荧光猝灭^[24-25]。研究表明^[26-27],在调节 pH 诱导蛋白质-多糖复合物解离过程中,复合物的最大荧光强度会逐渐增加,越来越接近蛋白质的最大荧光强度。这主要是因为多糖与蛋白质分离,蛋白质暴露的色氨酸增多,蛋白质的荧光猝灭效果消失。荧光光谱结果进一步证明,在 pH 5.0 下酯化大豆蛋白与壳聚糖形成了复合物。LI 等^[28]在对大麦醇溶蛋白与壳聚糖相互作用的研究中也发现了类似的结果。

2.3 乳化性分析

根据预实验结果,在 pH 5.0 时, SPI、11S 和 7S 的乳化活性为 1.98、1.95、2.61 m²/g, 乳化稳定性为 17.97、13.39、17.94 min。酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的乳化活性与乳化稳定性见图 3; 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的 Zeta 电位见表 1。

如图 3 所示,在 pH 5.0 时,相比于 MSPI、M11S 和 M7S, pH 偏移处理后的样品 MSPI (pH 3.0-5.0)、M11S (pH 3.0-5.0) 和 M7S (pH 3.0-5.0) 的乳化活性和乳化稳定性显著增加。这可能是由于酯化大豆蛋白 pH 从 3.0 变化到 5.0, 蛋白质分子展开, 有利于蛋白质吸附在油水界面上, 进而提高了蛋白质的乳化性能^[29]。在 pH 5.0 时, 添加壳聚糖后, MSPI、M11S 和 M7S 与壳聚糖复合物的乳化活性分别显著增加至 10.8、9.0、12.0 m²/g; MSPI、M11S 和 M7S 与壳聚糖复合物的乳化稳定性分别显著增加至 88.9、71.4、95.4 min; 相比于酯化大豆蛋白和酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0), 复合物的乳化性能最高。

酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物乳化性提高可能是由于酯化大豆蛋白与壳聚糖发生相互作用后, 复合物表面的电荷增多 (表 1), 进而乳化性质增强。LAWAL 等^[30]指出, 当油滴周围界面膜电离层的电势增加时, 体系的乳化活性和乳化稳定性提高。除此之外, 酯化大豆蛋白与壳聚糖作用可以提高乳状液体系的黏度, 减缓油滴的移动, 有利于乳液的稳定性增强。



注: 小写字母 (a~c) 表示酯化大豆蛋白之间乳化活性/乳化稳定性差异显著 ($p<0.05$); 小写字母 (a'~c') 表示酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 之间乳化活性/乳化稳定性差异显著 ($p<0.05$); 大写字母 (A~C) 表示酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物之间乳化活性/乳化稳定性差异显著 ($p<0.05$); *和**表示不同处理方式的酯化大豆蛋白及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物之间乳化活性/乳化稳定性差异显著 ($p<0.05$)。

图 3 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的乳化活性 (a) 与乳化稳定性 (b)

Fig. 3 Emulsifying activity (a) and emulsifying stability (b) of esterified soybean protein, esterified soybean protein (pH 3.0-5.0) and esterified soybean protein-chitosan complexes

表 1 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的 Zeta 电位

Table 1 Zeta potential of esterified soybean protein, esterified soybean protein (pH 3.0-5.0) and esterified soybean protein-chitosan complexes

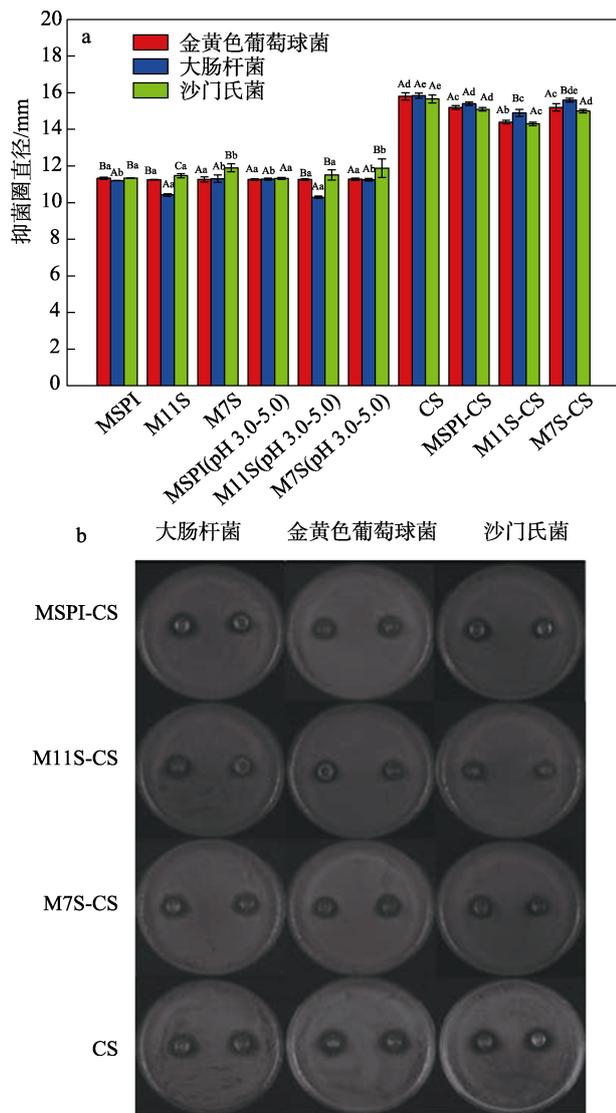
	Zeta 电位/mV
MSPI	22.93±1.05 ^b
MSPI (pH 3.0-5.0)	23.67±0.31 ^c
MSPI-CS	27.17±0.29 ^{B*}
M11S	20.50±0.70 ^a
M11S (pH 3.0-5.0)	20.91±0.28 ^a
M11S-CS	24.07±0.47 ^{A*}
M7S	21.43±0.21 ^{ab}
M7S (pH 3.0-5.0)	21.71±0.50 ^b
M7S-CS	27.17±0.35 ^{B*}

注: 小写字母 (a, b) 表示酯化大豆蛋白之间 Zeta 电位差异显著 ($p<0.05$); 小写字母 (a'~c') 表示酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 之间 Zeta 电位差异显著 ($p<0.05$); 大写字母 (A, B) 表示酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物之间 Zeta 电位差异显著 ($p<0.05$); *表示不同处理方式的酯化大豆蛋白及酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物之间 Zeta 电位差异显著 ($p<0.05$)。

2.4 抑菌性分析

采取牛津杯法^[13]研究样品对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用^[9], 结果见图 4。如图 4 所示, 在 pH 5.0 下, 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0)、壳聚糖和酯化大豆蛋白-壳聚糖

复合物对大肠杆菌、沙门氏菌以及金黄色葡萄球菌均具有抑制作用。与酯化大豆蛋白相比, 酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0) 对于细菌的抑制作用变化不显著; 而酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的抑菌效果增加显著, 在 3 种物质中抑菌效果最佳。已有大量文献报道了酯化大豆蛋白和壳聚糖的抑菌机理, 最被认可的抑菌机制是静电作用^[9,13]。



a—酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0)、壳聚糖、酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物对细菌的抑制作用; b—壳聚糖、酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物抑菌观察图

注: 小写字母 a~e 表示对同一细菌, 不同样品之间的抑制作用差异显著 ($p < 0.05$); 大写字母 A~C 表示同一样品, 对不同细菌的抑制作用差异显著 ($p < 0.05$)。

图 4 酯化大豆蛋白、酯化大豆蛋白 (pH 3.0-5.0)、壳聚糖、酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的抑菌性

Fig. 4 Antibacterial activity of esterified soybean protein, esterified soybean protein (pH 3.0-5.0), chitosan, esterified soybean protein-chitosan complexes

酯化大豆蛋白由于携带正电荷, 可以与细胞膜表面带负电荷的物质发生静电相互作用, 进而导致

细菌内容物泄出, 造成微生物凋亡^[13]。壳聚糖的抑菌作用同样来源于其表面存在大量的带正电荷的活性氨基, 而且壳聚糖还能进入微生物细胞内部进一步抑制其生命活动^[31]。当酯化大豆蛋白与壳聚糖形成复合物之后, 酯化大豆蛋白的净电荷量增加, MSPI-CS 的电位增至 (27.17 ± 0.29) mV, M11S-CS 的电位增至 (24.07 ± 0.47) mV, M7S-CS 的电位增至 (27.17 ± 0.35) mV (表 1)。这可能会导致复合物与微生物的细胞壁、细胞膜之间的静电作用力增强, 使其易于吸附至细菌表面并使细胞膜裂解, 细胞内容物泄露, 最终致使细菌凋亡^[32]。CHEN 等^[33]的研究结果证实了这一观点。

青霉素对于大肠杆菌的抑菌圈直径为 16.7 mm^[34], 与商品抑菌剂相比, MSPI-CS、M11S-CS、M7S-CS 对于大肠杆菌的抑菌圈直径分别为 15.6、14.9、15.4 mm; 青霉素对于金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 26.63 mm^[35], MSPI-CS、M11S-CS、M7S-CS 对于金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 15.2、14.4、15.2 mm; 庆大霉素、卡那霉素对于沙门氏菌的抑菌圈直径为 13 和 14 mm^[36], MSPI-CS、M11S-CS、M7S-CS 对于沙门氏菌的抑菌圈直径分别为 15.1、14.3、15.0 mm。上述实验结果表明, 酯化大豆蛋白与壳聚糖复合后不仅显著提高了蛋白质的抑菌活性, 尤其对沙门氏菌的抑制效果高于商品抑菌剂庆大霉素和卡那霉素的抑菌效果, 对延长大豆蛋白食品货架期具有重要意义。

2.5 乳液的平均粒径与 Zeta 电位

大豆蛋白是非常优良的食品级乳化剂, 近年来被广泛应用于乳液的配方中^[11,16], 乳液的平均粒径见表 2、Zeta 电位见表 3。

如表 2 所示, 在 pH 5.0 时, 天然 SPI、11S、7S 制备的乳液液滴尺寸超过了 3.0 μm , 乳液的液滴分散性差且容易聚集, 天然大豆蛋白难以制备具有较小粒径的乳液。在 pH 5.0 时, MSPI 和 M7S 制备的乳液平均粒径大小分别为 (256.9 ± 10.1)、(257.0 ± 8.1) nm, 差异不显著 ($p > 0.05$); M11S 制备的乳液粒径较大, 为 (438.7 ± 17.21) nm。酯化 SPI、11S、7S 乳液液滴尺寸远小于天然 SPI、11S、7S 制备的乳液液滴尺寸。该结果表明, 酯化改性显著改善了酸性条件下大豆蛋白稳定乳液的能力。在 pH 5.0 时, 以 MSPI、M7S 和 M11S 与壳聚糖复合物为乳化剂的乳液 Zeta 电位绝对值最高, 分别为 (22.07 ± 0.40)、(22.33 ± 0.88)、(20.68 ± 0.09) mV, MSPI-CS 制备的乳液平均粒径为 (255.2 ± 5.3) nm, M7S-CS 复合物制备的乳液平均粒径为 (253.6 ± 1.7) nm, 与 MSPI 乳液和 M7S 乳液相比, 乳液尺寸变化不显著。而 M11S-CS 制备的乳液平均粒径为 (315.6 ± 2.4) nm, 比 M11S 乳液平均粒径低了约 123 nm。

该结果说明,壳聚糖对不同酯化大豆蛋白乳液性质的影响存在差异。证明酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物在酸性条件下不会聚集,能够较好地吸附在油水界面,可以进一步提高大豆蛋白稳定乳液的作用。

表 2 乳液的平均粒径

Table 2 Mean particle size of emulsions

	天然蛋白/nm	酯化大豆蛋白/nm	酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物/nm
SPI	3500±100 ^{Ab}	256.9±10.1 ^{Aa}	255.2±5.3 ^{Aa}
7S	3840±140 ^{Bb}	257.0±8.1 ^{Aa}	253.6±1.7 ^{Aa}
11S	5130±170 ^{Cc}	438.7±17.2 ^{Bb}	315.6±2.4 ^{Ba}

注:小写字母 a~c 表示同一蛋白样品,不同改性方法制备乳液的粒径大小差异显著 ($p<0.05$);大写字母 A~C 表示同一改性方法,不同蛋白样品制备乳液的粒径大小差异显著 ($p<0.05$)。

表 3 乳液的 Zeta 电位

Table 3 Zeta potential of emulsions

	天然蛋白/mV	酯化大豆蛋白/mV	酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物/mV
SPI	-1.73±0.10 ^{Ca}	21.73±0.57 ^{Bb}	22.07±0.40 ^{Bb}
7S	-1.40±0.05 ^{Ba}	21.03±0.76 ^{Bb}	22.33±0.88 ^{Bb}
11S	1.21±0.11 ^{Aa}	19.27±0.57 ^{Ab}	20.68±0.09 ^{Ac}

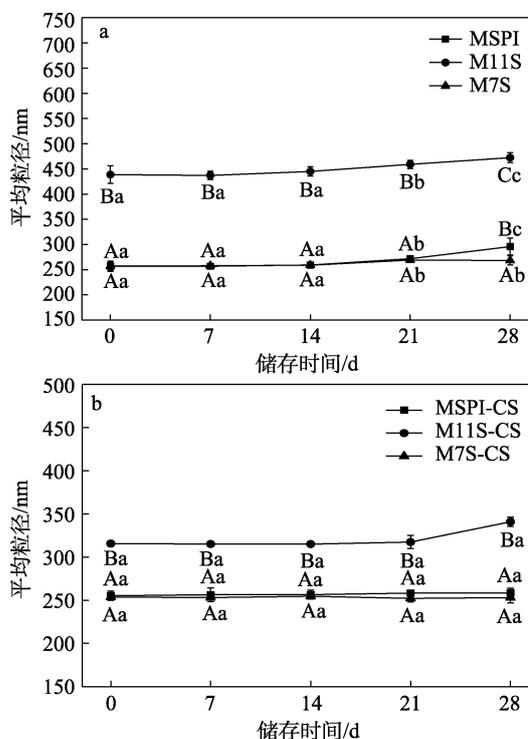
注:小写字母 a~c 表示同一蛋白样品,不同改性方法制备乳液的电位大小差异显著 ($p<0.05$);大写字母 A~C 表示同一改性方法,不同蛋白样品制备乳液的电位大小差异显著 ($p<0.05$)。

2.6 乳液的储存稳定性

储存时间对乳液平均粒径的影响见图 5。

如图 5a 所示,在 pH 5.0 时,所有酯化大豆蛋白乳液在前 14 d 平均粒径变化不显著 ($p>0.05$)。储存至第 28 d,MSPI 乳液的平均粒径由 (256.9±10.1) nm 增加至 (295.7±17.0) nm, M11S 乳液的平均粒径由 (438.7±17.2) nm 增加至 (472.3±10.0) nm, M7S 乳液的平均粒径由 (257.0±8.1) nm 增加至 (268.2±9.3) nm。在储存的 28 d 里,酯化大豆蛋白乳液的平均粒径均小于 500 nm,结果表明,在酸性条件下,酯化大豆蛋白制备的乳液具有良好的稳定性。结合表 3 可知,酯化大豆蛋白乳液液滴表面携带较高的正电荷,液滴之间具有足够大的静电斥力。因此,3 种酯化大豆蛋白乳液具有良好的存储稳定性。如图 5b 所示,酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物乳液具有更强的稳定性。经过 28 d 储存,MSPI-CS 乳液和 M7S-CS 乳液的平均粒径变化不显著 ($p>0.05$);在前 21 d 存储过程中, M11S-CS 乳液的平均粒径变化不显著 ($p>0.05$)。结果说明,在酸性条件下,壳聚糖提高了酯化大豆蛋白乳液的稳定性。本实验中壳聚糖改善蛋白质乳液的稳定性主要

归因于以下两方面:(1)壳聚糖提高了乳液体系的黏度,延缓了乳液中油滴的移动速率,防止乳液发生絮凝;(2)蛋白质与壳聚糖通过相互作用在油/水界面形成结实的界面膜,能够防止液滴聚集,进而稳定乳液^[37]。



注:小写字母 a~c 表示不同存储时间下,同一乳液样品粒径大小差异显著 ($p<0.05$);大写字母 A~C 表示同一存储时间下,不同乳液样品粒径大小差异显著 ($p<0.05$)。

图 5 储存时间对乳液平均粒径的影响

Fig. 5 Effect of storage time on the mean particle size of emulsions

3 结论

(1) 酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物的红外光谱分析表明,酯化大豆蛋白与壳聚糖之间存在氢键作用;荧光光谱分析表明,壳聚糖的加入减少了酯化大豆蛋白白色氨酸的暴露,进一步证明了壳聚糖和酯化大豆蛋白之间存在相互作用。

(2) 酯化大豆蛋白与壳聚糖复合后,由于两者发生相互作用,复合物表面的电荷增多,乳化活性和乳化稳定性均显著提高;同时,导致复合物与微生物的细胞壁、细胞膜之间的静电作用力增强,抑菌活性显著增强。

(3) 相比于大豆蛋白乳液和酯化大豆蛋白乳液,酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物乳液的平均粒径更低,Zeta 电位上升;经过 28 d 储存,酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物乳液的平均粒径变化不显著,具有更强的储存稳定性。

以上实验结果表明, 具有乳化性和抑菌性双重功效的酯化大豆蛋白-壳聚糖复合物可以作为复合乳化剂应用于酸性乳液的制备中。一方面拓宽了大豆蛋白在食品领域的应用范围; 另一方面为制备具有高稳定性的酸性乳液奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] MUJOO R, TRINH D T, NG P K W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture [J]. *Food Chemistry*, 2003, 82(2): 265-273.
- [2] DING J (丁俭), SUI X N (隋晓楠), WANG J (王婧), *et al.* Effect of ultrasonic treatment on stability of oil-in-water (O/W) emulsion containing soybean protein isolate-chitosan complex[J]. *Food Science (食品科学)*, 2018, 39(13): 74-80.
- [3] LIU Y C (刘永创), YANG X Q (杨晓泉), GUO J (郭健), *et al.* Emulsifying properties of soy protein isolate at pH near the isoelectric point[J]. *Modern Food Science and Technology (现代食品科技)*, 2015, 31(5): 84-89.
- [4] SITOHY M, CHOBERT J M, HAERTLE T. Improvement of solubility and of emulsifying properties of milk proteins at acid pHs by esterification[J]. *Die Nahrung*, 2001, 45(2): 87-93.
- [5] WU X (吴溪), CHEN G (陈国), KAN C Y (阚成友). Research progress in chemically-modified soy protein-based polymer materials[J]. *Modern Chemical Industry (现代化工)*, 2009, 29(10): 14-18.
- [6] PINA-PEREZ M C, PEREZ M A F. Antimicrobial potential of legume extracts against foodborne pathogens: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 72: 114-124.
- [7] AGULLO E, RODRIGUEZ M S, RAMOS V, *et al.* Present and future role of chitin and chitosan in food[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2003, 3(10): 521-530.
- [8] MCCLEMENTS D J, JAFARI S M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018, 251: 55-79.
- [9] YUAN Y, WAN Z L, YIN S W, *et al.* Stability and antimicrobial property of soy protein/chitosan mixed emulsion at acidic condition[J]. *Food & Function*, 2013, 4(9): 1394-1401.
- [10] LIU G N, HU M, DU X Q, *et al.* Effects of succinylation and chitosan assembly at the interface layer on the stability and digestion characteristics of soy protein isolate-stabilized quercetin emulsions[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 154: 112812.
- [11] LI Y Y, JIN H, SUN X T, *et al.* Physicochemical properties and storage stability of food protein-stabilized nanoemulsions[J]. *Nanomaterials*, 2018, 9(1): 25.
- [12] WANG Y T, WANG Z J, HANDA C, *et al.* Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of β -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 165-172.
- [13] SITOHY M, OSMAN A. Antimicrobial activity of native and esterified legume proteins against gram-negative and gram-positive bacteria[J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(1): 66-73.
- [14] CHANG H W, TAN T B, TAN P Y, *et al.* Formation and characterization of thiol-modified fibrillated whey protein isolate solution with enhanced functionalities[J]. *Journal of Food Engineering*, 2017, 214: 277-286.
- [15] SUN X T, JIN H, LI Y Y, *et al.* The molecular properties of peanut protein: Impact of temperature, relative humidity and vacuum packaging during storage[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2618.
- [16] LIU C, JIN H, YU Y, *et al.* The improvement of nanoemulsion stability and antioxidant *via* protein-chlorogenic acid-dextran conjugates as emulsifiers[J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(6): 1094.
- [17] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26 (3): 716-723.
- [18] JIN H (金花), JIANG L Z (江连洲), FENG H Y (冯海莹), *et al.* Effects of covalent and non-covalent interaction with chlorogenic acid on the stability and antioxidant activity of black soybean protein isolate-stabilized nanoemulsion[J]. *Food Science (食品科学)*, 2022, 43(4): 17-24.
- [19] KEPPLER J K, MARTIN D, GARAMUS V M, *et al.* Functionality of whey proteins covalently modified by allyl isothiocyanate. Part I physicochemical and antibacterial properties of native and modified whey proteins at pH 2 to 7[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 65: 130-143.
- [20] ESPINOSA-ANDREWS H, SANDOVAL-CASTILLA O, VAZQUEZ-TORRES H, *et al.* Determination of the gum arabic-chitosan interactions by fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79 (3): 541-546.
- [21] YUAN Y, KONG Z Y, SUN Y E, *et al.* Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 75: 171-179.
- [22] HUANG G Q, SUN Y T, XIAO J X, *et al.* Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 534-539.
- [23] ZHANG W W (张唯唯), HE Z D (何振东), MA T Y (马天怡), *et al.* Extreme acid and alkaline pH-shifting processes improving the solubility and emulsifying properties of ginkgo seed protein isolate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(6): 1204-1211.
- [24] WANG S N, YANG J J, SHAO G Q, *et al.* pH-induced conformational changes and interfacial dilatational rheology of soy protein isolated/soy hull polysaccharide complex and its effects on emulsion stabilization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 109: 106075.
- [25] MA T Y (马天怡), GUO F X (郭凤仙), HE Z D (何振东), *et al.* L-Arginine/L-lysine ameliorating the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(1): 150-157, 163.
- [26] FAN X J (樊雪静). Study on emulsification and emulsification stability of soybean protein isolate-oligosaccharide complex system[D]. Harbin: Northeast Agricultural University (东北农业大学), 2018.
- [27] LIANG S C, LIU Y B, XIANG J, *et al.* Fabrication of a new fluorescent polymeric nanoparticle containing naphthalimide and investigation on its interaction with bovine serum albumin[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2014, 116: 206-210.
- [28] LI F F, LI X H, HUANG K L, *et al.* Preparation and characterization of pickering emulsion stabilized by hordein-chitosan complex particles[J]. *Journal of Food Engineering*, 2021, 292: 110275.
- [29] KEERATI-U-RAI M, MIRIANI M, IAMETTI S, *et al.* Structural changes of soy proteins at the oil-water interface studied by fluorescence spectroscopy[J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2012, 93(1): 41-48.
- [30] LAWAL O S, ADEBOWALE K O, ADEBOWALE Y A. Functional properties of native and chemically modified protein concentrates from bambara groundnut[J]. *Food Research International*, 2007, 40(8): 1003-1011.
- [31] MA H B (马海宾), ZHAI C C (翟婵婵), WANG S K (王胜坤), *et al.* The antibacterial effect of different molecular weight of chitosan[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin (中国农学通报)*, 2014, 30(31): 267-271.
- [32] WANG H B, LU F, MA C Q, *et al.* Carbon dots with positive surface charge from tartaric acid and *m*-aminophenol for selective killing of gram-positive bacteria[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(1): 125-130.
- [33] CHEN L C, CHIANG W D, CHEN W C, *et al.* Influence of alanine uptake on staphylococcus aureus surface charge and its susceptibility to two cationic antibacterial agents, nisin and low molecular weight chitosan[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(4): 2397-2403.
- [34] LI Y (李莹), YE M (叶明). Bacteriostatic effect of several antibiotics on *escherichia coli* and *bacillus subtilis*[J]. *Journal of Quanzhou Normal University (泉州师范学院学报)*, 2017, 35(2): 35-39.
- [35] HAN C (韩畅), SU L J (苏林洁), LIU X (刘星), *et al.* Antibacterial and antioxidant effects of different polar solvent extracts from chicory stems[J]. *Shizhen Traditional Chinese Medicine (时珍国医国药)*, 2019, 30(8): 1825-1828.
- [36] JI S L (吉尚雷), LIU X (刘欣), LIU L Y (刘立英), *et al.* Isolation, identification and drug resistance analysis of salmonella from broilers[J]. *Morden Animal Husbandry (现代畜牧兽医)*, 2021, (6): 72-74.
- [37] BURGOS-DÍAZ C, WANDERSLEBEN T, MARQUES A M, *et al.* Multilayer emulsions stabilized by vegetable proteins and polysaccharides [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2016, 25: 51-57.